

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05300

研究課題名(和文) 分子疫学的手法を用いたグローバルスタンダードな重度う蝕リスク小児特定法の構築

研究課題名(英文) Construction of global standard molecular epidemiological method for identification of the children at risk for severe dental caries

研究代表者

仲野 和彦 (Nakano, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00379083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：タイ・バンコクの幼稚園・保育園施設において、3～4歳の園児から歯科健診時に唾液サンプルを採取し、Streptococcus mutansおよび乳酸桿菌の分離を行った。S. mutansに関しては、分子疫学的分類法の1つであるMultilocus sequence typing (MLST) 法におけるデータを追加し、臨床所見との関連の可能性が示された。乳酸桿菌に関しては、Lactobacillus fermentum が重度う蝕と関連する可能性が示されたので、MLST法による分類を行ったところ、これまでの報告にない新たなSequence typeが同定された。

研究成果の概要(英文)：Saliva specimens were taken from 3- and 4-year-old Thai children attending a kindergarten and nursery school in Bangkok, Thailand, from which Streptococcus mutans and Lactobacillus species were isolated using selective medium for each. Findings obtained from the S. mutans isolates provided new data to be added to a previously constructed multilocus sequence typing (MLST) scheme, which revealed the possibility of the correlation of a specific group of strains with clinical findings related to dental caries. As for the Lactobacillus species, Lactobacillus fermentus was shown to be associated with severe dental caries, thus several strains were classified using an MLST scheme, with novel sequence types revealed.

研究分野：小児歯科学

キーワード：分子疫学的手法 Streptococcus mutans 乳酸桿菌 タイ 幼稚園 保育園 う蝕 歯科健診

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国ではう蝕罹患率が低下しているが、重度の小児う蝕が社会問題になっている国や地域が依然存在しており、重度う蝕の存在は認識されながらも、解決する上での財源やマンパワーなどの要因から、その対応に苦慮しているのが実情である。実際に、既知の重度う蝕発生に影響する生活習慣や口腔衛生習慣等をターゲットにした対応が行われている地域もあるが、概して功を奏しているとは言いがたい。この実情を踏まえると、解決のための斬新なアプローチが必要であると考えられる。その1つとして、重度う蝕を発生させる原因細菌を保有する対象者を絞り込んで、その発症前に精力的な対応を行い予防するというアプローチは効果的であるといえる。

これまでに、長期にわたりう蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* や乳酸桿菌に関する基礎的・臨床的研究を展開してきた。2007年には、タイ人留学生の Jinthana Lapidattanakul 氏(当時大学院博士課程在学、現タイ・マヒドン大学歯学部口腔細菌学講座准教授)とともに、*S. mutans* における分子疫学的分類法の1つである Multilocus sequence typing (MLST) 法を確立した。その後、日本人、タイ人、フィンランド人から分離された菌株の情報を加えることでデータベースを拡大させるとともに、インターネット上に公開し諸外国の研究者も広く用いることができるようにしてきた(<https://pubmlst.org/oralstrep/>)。

MLST 法では系統樹を形成することで、各菌株の形成する分子疫学的なグループが明らかにできる。MLST 法はある種の抗生物質耐性株や病原性の高い菌株を推定するために用いられることもあるが、これまでう蝕に対する病原性のリスク判定に用いられたことはない。これは、MLST 法の応用がう蝕の研究者自体の念頭になかったことも挙げられるが、従来の MLST 法に重度う蝕を呈する患者からの分離株が含まれていないことにも起因すると思われる。また、我が国以外からの分離株のデータが少ないことも影響していると思われる。そこで、重度う蝕を呈する日本人小児に加え、タイ人小児を対象から分離した菌株を用いる研究を行うことで「グローバルスタンダードな重度

う蝕リスク小児特定法の構築」を目指すことができるのではないかとこの着想に至った。さらに、対象とするう蝕原性細菌を *S. mutans* だけではなく乳酸桿菌にも拡大して分析するべきであるという考えに至った。

Lapidattanakul 准教授は歯科医師として臨床にも従事しており、大学院在学中に日本における小児歯科臨床の実情も十分理解している。その上で、タイ人小児のう蝕罹患率は高いことを実感している。そこで、バンコク市内の幼稚園・保育園施設に協力を依頼し、歯科検診を行う際にう蝕原性細菌の分離を行って分析することを企画立案するに至った。

2. 研究の目的

- (1) タイ人の重度う蝕の小児の唾液から分離した *S. mutans* 株のデータを加えた MLST 法を構築し、重度う蝕を引き起こした小児からの分離株が系統樹上でグループを形成するかを明らかにする。
- (2) タイ人の重度う蝕の小児の唾液から乳酸桿菌の臨床株を分離し、菌種の特定制を行う。
- (3) 唾液中の *S. mutans* および乳酸桿菌の存在とう蝕に関する臨床データとの関連性を検討する。
- (4) 乳酸桿菌が重度う蝕の病原性に重要な役割を占める可能性がある場合には、その乳酸桿菌種を対象にした MLST 法による分析を行う。

3. 研究の方法

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室と岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学分野およびマヒドン大学歯学部口腔細菌学講座の3施設の構成員でチームを形成して遂行した。

研究期間中には、大阪大学および岡山大学の教員および大学院生が、初年度の打ち合わせ2回を含めて合計7回(延べ26人)バンコクを訪問し活動を行った。

また、マヒドン大学の研究協力者を毎年1回以上、大阪大学(主に *S. mutans* の分析)もしくは岡山大学(主に乳酸桿菌の分析)に招いて、得られたデータのディスカッションおよび詳細な研究打ち合わせを行った。

なお、本研究はマヒドン大学歯学部倫理審査委員会の承認のもと、幼稚園・保育園施設の施設長の同意を得てから遂行した。また、本研究内容について保護者に説明を行い、協力の同意が得られた小児のみを対象とした。

(1) タイ人小児に対する臨床診断と口腔サンプルの収集

タイ・バンコクの幼稚園・保育園施設において、歯科健診の際に3～4歳児の合計184名から唾液サンプルを採取した。採取したサンプルをミュートスレンサ球菌および乳酸桿菌の選択培地に播種し、それぞれの臨床株を分離した。

(2) *S. mutans* の MLST 法のデータ解析と臨床診断との関連の分析

分離した *S. mutans* 株から染色体 DNA を抽出し、PCR 法を用いて8種のハウスキーピング遺伝子の断片を増幅した。その後、DNA シークエンサーを用いてそれぞれの遺伝子配列を決定した。得られた情報を従来の MLST 法のデータベースに加えることで、新たな系統樹の作製を行った。

(3) 分離した乳酸桿菌の解析

唾液から分離された乳酸桿菌は、Api® 50CH キットを用いて、それぞれの菌種の同定を行った。

重度う蝕の対象者から最も高頻度で分離された *Lactobacillus fermentum* に関しては、これまでに報告のある Dan ら (2015) の方法で、11 種類のハウスキーピング遺伝子の配列を特定することで、MLST 法による分子疫学的分類を行った。

< 引用文献 >

Dan T, Liu W, Song Y, et al. The evolution and population structure of *Lactobacillus fermentum* from different naturally fermented products as determined by multilocus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology* 15; 107, 2015.

4. 研究成果

(1) タイ人小児から採取した唾液サンプルからの菌の分離とう蝕との関連

合計 184 名のうち、147 名 (80%) から *S. mutans* 株が分離され、82 名 (45%) から乳酸桿菌が分離された。統計学的解析から、唾液中の *S. mutans* および乳酸桿菌の存在とう蝕の有無との間に明確な相関関係を認めた。また、重症う蝕の対象者の群は、それ以外の対象者の群と比較して、*S. mutans* と乳酸桿菌の両方が同時に検出される率が有意に高いことが示された。

(2) *S. mutans* の MLST 法のデータ解析と臨床診断との関連の分析

合計 27 人 (う蝕なしの対象 13 名と重度う蝕の対象 14 名) からそれぞれ 2 株ずつ分離した合計 54 株において 8 つのハウスキーピング遺伝子の配列を特定し、新たな系統樹を作製したが、う蝕の有無と明確に関連するグループの特定はできなかった。一方で、関連の可能性があるグループに関する所見が認められたため、今後分析対象株数を増やして再度検討していく必要性が示された。

(3) 分離した乳酸桿菌の解析

合計 82 名から分離された乳酸桿菌のうち、約半数から *L. fermentum* が分離され、*Lactobacillus paracasei* (44%) が続いた。*L. fermentum* が分離された対象では、他の乳酸桿菌が分離された対象よりも、う蝕歯数が有意に多いことが明らかになった。また、う蝕のない対象者 11 人からも乳酸桿菌が検出されたが、その群の対象者においては、*L. paracasei* が主要な菌種であることが示された。

(4) *L. fermentum* の MLST 法による分類

Dan ら (2015) の方法で分類したところ、これまでの報告 (モンゴル人や中国人) には存在していないアレルが多く同定されたため、今後、この菌種における MLST 法によるデータベースの充実と臨床所見との関連について検討する必要性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Lapirattanakul J, Takashima Y,
Tantivitayakul P, Maudcheingka T,
Leelataweewud P, Nakano K,
Matsumoto-Nakano M. Cariogenic
properties of *Streptococcus mutans*
clinical isolates with sortase
defects. Archives of Oral Biology 査
読有 81; 7-14, 2017.
DOI:10.1016/j.archoralbio.2017.04.
018.

〔学会発表〕（計6件）

森本節代、高島由紀子、藤田一世、仲
野道代．小児口腔より分離された乳酸
菌の齲蝕原性能の検討 第34回日本小
児歯科学会中四国地方会、愛媛県松山
市、2015年10月4日
Morimoto S, Fujita K,
Matsumoto-Nakano M.
Collagen-binding properties of
Lactobacillus species isolated from
Japanese children. 10th Conference
of Pediatric Dentistry Association
of Asia, Tokyo, May 26-28, 2016.
Lapirattanakul J, Nakano K,
Maudcheingka T, Tantivitayakul P,
Morikawa Y, Ogaya Y, Hatakeyama R,
Tsunoda Y, Matsumoto-Nakano M.
Characteristics of oral Lactobacilli
from a group of Thai children. The
International Dental Collaboration
of the Mekong River Region (IDCMR)
2016, Kuala Lumpur, Malaysia,
November 17-19, 2016.
Morimoto S, Takashima Y,
Matsumoto-Nakano M. Interaction
between Lactobacillus strains and
Streptococcus mutans strains for
biofilm formation. 95th General
Session & Exhibition of the IADR, San
Francisco, March 22-26, 2017.
森本節代、高島由紀子、仲野道代．小
児口腔より分離されたラクトバシラス
が *Streptococcus mutans* のバイオフィ
ルム形成に与える影響について 第55
回日本小児歯科学会大会、福岡県北九
州市、2017年5月25-26日．

森本節代、森川優子、高島由紀子、仲
周平、稲葉裕明、仲野道代．乳酸菌が
産生するバクテリオシンが口腔バイオ
フィルム形成に与える影響について
第36回日本小児歯科学会中四国地方会
大会、広島県広島市、2017年11月5日．

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/research/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

仲野 和彦 (NAKANO, Kazuhiko)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：00379083

(2)研究分担者

野村 良太 (NOMURA, Ryota)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：90437385

大川 玲奈 (OKAWA, Rena)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：80437384

仲野 道代 (NAKANO, Michiyo)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30359848

仲 周平 (NAKA, Shuhei)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：10589774

高島 由紀子 (TAKASHIMA, Yukiko)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30589768

(4)研究協力者

ラピラッタナクン ジンタナ
(LAPIRATTANAKUL, Jinthana)
タイ・マヒドン大学・歯学部・准教授
大阪大学・歯学研究科・特任准教授